



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3953—2014

---

## 国境口岸轮状病毒(A 组)、诺如病毒、 星状病毒的多重 RT-PCR 检测方法

Detection of rotavirus(group A), norovirus and astrovirus  
by multiple RT-PCR at frontier port

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国 发 布  
国家质量监督检验检疫总局

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、深圳市计量质量检测研究院、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：莫秋华、谭华、李卫岗、梁玉英、胡科新、罗忠鑫、史咏梅、杨泽、涂承宁、祝琰。

# 国境口岸轮状病毒(A组)、诺如病毒、 星状病毒的多重 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸轮状病毒(A组)、诺如病毒、星状病毒多重 RT-PCR 检测的对象、检测方法  
及结果报告。

本标准适用于国境口岸轮状病毒(A组)、诺如病毒、星状病毒的实验室检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1720 出入境口岸轮状病毒感染监测规程

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**轮状病毒 rotavirus**

属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)轮状病毒属(*Rotavirus*),为双链 RNA 病毒,基因组分 11 个节段,是引起人类、哺乳动物类和鸟类腹泻的主要病原体。轮状病毒有 7 个血清组(A~G),其中 A、B、C 组能引起人和动物腹泻,以 A 组最常见,它是婴幼儿腹泻首要的致病原。

### 3.2

**诺如病毒 Norovirus**

**诺瓦克样病毒 Norwalk-like viruses; NLV**

**诺沃克样病毒 Norwalk-like viruses; NLV**

属于杯状病毒科(Caliciviridae)诺如病毒属(*Norovirus*),为单股正链 RNA 病毒,是引起成人和婴幼儿急性非细菌性胃肠炎的重要病原体,全世界范围内均有流行,全年均可发生感染。诺如病毒原称为诺瓦克样病毒或诺沃克样病毒(Norwalk-like viruses, NLV),诺瓦克病毒(Norwalk virus, NV)是这组病毒的代表种,2002 年第 8 届国际病毒分类委员会将其正式命名为 Norovirus,我国按照音译称为诺如病毒。

### 3.3

**星状病毒 Astrovirus**

属于星状病毒科(Astroviridae)哺乳类星状病毒属(*Mamastrovirus*),为单股正链 RNA 病毒,是引起婴幼儿腹泻的重要病原体。

### 3.4

#### **逆转录聚合酶链反应 reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR**

将 RNA 的逆转录(RT)和 cDNA 的聚合酶链式扩增(PCR)相结合的技术。本标准采用一步法逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。在一步法 RT-PCR 中,首先以 RNA 为模板,利用下游特异性引物,在依赖 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)的作用下转录合成互补 DNA(cDNA),该步称作“逆转录”;随后,再以 cDNA 为模板,利用上游和下游特异性引物,在 DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 循环扩增;最终使 RNA 分子的某个特定区域(目的片段)被扩增达几百万倍。

### 3.5

#### **相同标签辅助-无引物二聚体 homo-tag assisted non-dimer; HAND**

采用同源加尾的方式,即在上游引物和下游引物的 5'末端分别加上相同的标签序列,利用标签序列作为通用引物扩增由特异性引物产生的 PCR 片段,从而能有效地抑制引物二聚体的产生,减小多重 PCR 体系中各基因间扩增效率的差异,提高多重 PCR 的稳定性、均一性和扩增效率。HAND 系统又可译为同源加尾系统。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 4.1 DEPC: diethyl pyrocarbonate, 焦碳酸乙二酯。
- 4.2 PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。
- 4.3 bp: base pair, 碱基对。

## 5 检测对象

- 5.1 国境口岸发现的有呕吐、腹泻和发热等症状,疑似腹泻病毒感染的急性肠胃炎病人。
- 5.2 其他申请检验的人员。

## 6 生物安全和 PCR 防污染要求

实验室生物安全应符合 GB 19489 的规定。PCR 防污染措施按 WS/T 230 和 SN/T 1193 的规定执行。

## 7 主要仪器

- 7.1 二级 B 型生物安全柜。
- 7.2 台式高速冷冻离心机(最高离心力 12 000 g 以上)。
- 7.3 漩涡振荡器。
- 7.4 冰箱: 4℃、-20℃和-70℃。
- 7.5 超净工作台。
- 7.6 微型离心机。
- 7.7 PCR 热循环仪。
- 7.8 电子天平( $d=1\text{ mg}$ )。
- 7.9 微波炉。

- 7.10 电泳仪。
- 7.11 凝胶成像分析系统。
- 7.12 高压灭菌锅。
- 7.13 超纯水器或双蒸水器。
- 7.14 微量可调移液器一套(含以下 5 种规格:10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 mL)。

## 8 主要试剂

- 8.1 无 RNA 酶的 DEPC 水。
- 8.2 RT-PCR 引物应为 PAGE 以上级别纯化,引物序列见 9.2.3.1。
- 8.3 一步法 RT-PCR 基础试剂:宝生物工程(大连)有限公司 PrimeScript One Step RT-PCR Kit<sup>1)</sup>。
- 8.4 电泳缓冲液(10 $\times$ TBE):称取 108 g Tris 碱,7.44 g Na<sub>2</sub>EDTA $\cdot$ H<sub>2</sub>O 和 55 g 硼酸,溶于 800 mL 的双蒸水中,充分搅拌溶解后加水定容至 1 L,室温保存。
- 8.5 溴化乙锭(EB):10 mg/mL,使用浓度为 0.5  $\mu$ g/mL。
- 8.6 Golden View 核酸染料:使用浓度为 5  $\mu$ L/100 mL。

## 9 检验程序

### 9.1 样品采集

粪便标本和呕吐物标本的采集按照 SN/T 1720 执行。

### 9.2 实验室检验

#### 9.2.1 样品处理

取黄豆大小约 100 mg~200 mg 的粪便标本或呕吐物,或 100  $\mu$ L~200  $\mu$ L 水样便,加入 800  $\mu$ L 的生理盐水,剧烈振荡混匀,制成 10%~20%的悬液;然后 4  $^{\circ}$ C,8 000 r/min 离心 5 min;转移上清至灭菌的干净离心管。不能立即进行检测时,样本冻存于-70  $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

#### 9.2.2 病毒核酸提取

##### 9.2.2.1 Trizol 法

取 9.2.1 处理好的样本 150  $\mu$ L,加入 750  $\mu$ L Trizol 液,振荡混匀后室温静置 5 min,然后加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷,盖紧离心管,振荡混匀 15 s 后室温静置 5 min,4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 10 min,取上层水相至另一离心管中,加入等量异丙醇沉淀 RNA,充分混匀后室温放置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再加入 1 mL 的 70%乙醇洗涤一次,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,室温放置 2 min~3 min 后加入 20  $\mu$ L~50  $\mu$ L DEPC 水(或其他核酸溶解液)溶解核酸沉淀,分装后于-70  $^{\circ}$ C 条件下保存,备用。

##### 9.2.2.2 试剂盒提取纯化核酸法

按适用于病毒基因组提取的商品试剂盒说明书操作。

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可和推荐。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

SN/T 3953—2014

### 9.2.3 多重 RT-PCR 检测

#### 9.2.3.1 引物

采用 HAND 系统设计引物,引物应用液浓度配制成 20  $\mu\text{mol/L}$ ,序列分别如下:

a) 轮状病毒(A 组)引物(扩增片段大小 186 bp):

——RotaVP6-FP:5'-ggggtcccaaaagggtcagtTGTGAATCAGTRCTTGCSGA-3';

——RotaVP6-RP:5'-ggggtcccaaaagggtcagtTCYCTVGATGGTGAATAGTTAGTRAT-3'。

b) 诺如病毒引物(扩增片段大小 376 bp):

——NLV-FP:5'-ggggtcccaaaagggtcagtACAGATACCACTATGATGCAGAYTA-3';

——NLV-RP:5'-ggggtcccaaaagggtcagtCAATTTCATCATCACCATARAARGA-3'。

c) 星状病毒引物(扩增片段大小 270 bp):

——AstV-FP:5'-ggggtcccaaaagggtcagtACYAGATTYAGATCCGTGA-3';

——AstV-RP:5'-ggggtcccaaaagggtcagtACRACATGTGCTGCTGTTACT-3'。

d) 通用引物:

——RNA-P20:5'-ggggtcccaaaagggtcagt-3'。

注:简并碱基中 R 为 A 或 G;S 为 C 或 G;Y 为 C 或 T;V 为 A 或 C 或 G。

#### 9.2.3.2 阳性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照和空白对照。阳性对照为 3 种病毒阳性样本核酸的混合物,或者为克隆轮状病毒(A 组)、诺如病毒和星状病毒的部分核苷酸序列(应包含扩增区域在内)在体外转录合成的 RNA;空白对照用无菌水作为多重 RT-PCR 反应的模板。

#### 9.2.3.3 反应体系组成

一步法多重 RT-PCR 反应体系采用以下参数:2 $\times$ one step RT-PCR 缓冲液 10  $\mu\text{L}$ ;引物 RotaVP6-FP 和 RotaVP6-RP 各 0.25  $\mu\text{L}$ ;引物 NLV-FP 和 NLV-RP 各 0.1  $\mu\text{L}$ ;引物 AstV-FP 和 AstV-RP 各 0.12  $\mu\text{L}$ ;通用引物 RNA-P20 1.5  $\mu\text{L}$ ;RT-PCR Enzyme Mix(含逆转录酶和 *Taq* DNA 聚合酶)1.0  $\mu\text{L}$ ;最后加 RNA 模板 6.56  $\mu\text{L}$ ,使反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

#### 9.2.3.4 反应条件

一步法多重 RT-PCR 反应条件:50  $^{\circ}\text{C}$  反转录 30 min;94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保温。因不同 PCR 仪器的性能差异,可根据条件优化适当调整 PCR 退火温度和时间。

#### 9.2.3.5 琼脂糖凝胶电泳

用 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液制备 2.0%(质量分数)的琼脂糖凝胶平板(含 0.5  $\mu\text{g/mL}$  溴化乙锭或 GoldenView 或其他等效染料)。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。取 5  $\mu\text{L}$  多重 RT-PCR 扩增产物和 1  $\mu\text{L}$  上样缓冲液混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照,推荐使用 100 bp DNA 分子量标准。按 8 V/cm 的电压条件电泳约 30 min~40 min。采用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果。

#### 9.2.4 检验结果判断及报告

当阳性对照出现 3 条目的片段条带,而空白对照没有任何核酸条带出现时才可对样本进行结果判断及报告,否则视为试验失败,需重新试验。本标准检验结果判断及报告如下:

- a) 检验样本出现 186 bp 条带时,报告“检出轮状病毒(A 组)特异性基因(RT-PCR 法,186 bp)”;
  - b) 检验样本出现 376 bp 条带时,报告“检出诺如病毒特异性基因(RT-PCR 法,376 bp)”;
  - c) 检验样本出现 270 bp 条带时,报告“检出星状病毒特异性基因(RT-PCR 法,270 bp)”;
  - d) 检验样本未出现任何条带时,报告“未检出轮状病毒(A 组)、诺如病毒、星状病毒特异性基因(RT-PCR 法)”。
-